

## ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ НОРМИ ТА ПАТОЛОГІЇ ЗА СЕЛЕКТИВНОГО БІОХІМІЧНОГО СКРИНІНГУ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ, ЩО СУПРОВОДЖУЮТЬСЯ ПІДВИЩЕНОЮ ЕКСКРЕЦІЄЮ ОЛІГОСАХАРИДІВ

Н. Й. МИЦИК<sup>1,2</sup>, Н. В. ОЛЬХОВИЧ<sup>1,2</sup>, Н. Г. ГОРОВЕНКО<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Національна дитяча спеціалізована лікарня «ОХМАТДИТ» МОЗ України, Київ;

<sup>2</sup>ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ;

<sup>3</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна;  
e-mail: [mysuk\\_nat@ukr.net](mailto:mysuk_nat@ukr.net)

Олігосахариди – клас полімерних вуглеводів, які входять до складу глікозидної частини молекул глікопротеїнів та гліколіпідів. Порушення функції лізосомальних гідролаз за лізосомних хвороб накопичення (ЛХН) призводить до часткової або повної відсутності деградації певних глікопротеїнів та гліколіпідів і, як наслідок, до накопичення в лізосомах клітин характерних нерозщеплених олігосахаридних ланцюгів та підвищення їх екскреції із сечею. Метою нашої роботи був аналіз результатів тонкошарової хроматографії (ТШХ) олігосахаридів сечі у здорових осіб різних вікових груп та в пацієнтів із ЛХН для розробки практичних рекомендацій щодо диференціації норми і патології в ході селективного біохімічного скринінгу ЛХН. Одержані результати показали, що в більшості здорових осіб на пластинах ТШХ відмічалась незначна екскреція олігосахаридів із  $R_{lac} > 0,15$ , що можна характеризувати як фізіологічну олігосахаридурію, яка обумовлена особливостями харчового раціону дітей різного віку та метаболізму в лізосомах. Тому під час інтерпретації зразків сечі пацієнтів з підозрою на наявність ЛХН діагностично значимими на ТШХ-пластинах є наявність груп олігосахаридів, які не зустрічаються в зразках здорових осіб, а також всі фракції зі значенням  $R_{lac} < 0,15$ .

*Ключові слова:* олігосахариди, ТШХ, олігосахаридурія, лізосомні хвороби накопичення.

Олігосахариди – це клас вуглеводів із низькою молекулярною масою, молекули яких містять від 3 до 10 моносахаридних залишків, з'єднаних між собою глікозидними зв'язками [1]. Олігосахариди входять до складу глікозидної частини молекул глікопротеїнів та гліколіпідів і діляться на ди-, три-, тетрасахариди і т.д. залежно від кількості моносахаридних залишків.

Деградація глікопротеїнів та гліколіпідів відбувається переважно в лізосомах за участю лізосомальних гідролаз, таких як нейрамінідаза,  $\alpha$ -фукозидаза,  $\alpha$ - і  $\beta$ -манозидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ - і  $\beta$ -глюкозидаза, N-ацетилгексозамінідаза тощо [2, 3]. Дефіцит активності певних лізосомальних гідролаз, який виникає внаслідок генетичного дефекту, що порушує структуру або процесинг цих ензимів, призводить до часткової або повної відсутності деградації певних глікопротеїнів або гліколіпідів і, як наслідок, на-

копичення в лізосомах клітин характерних нерозщеплених субстратів [4]. Велика група спадкових захворювань, які виникають внаслідок таких метаболічних порушень, отримала назву лізосомні хвороби накопичення (ЛХН).

ЛХН – група спадкових метаболічних захворювань, яка налічує близько 60 нозологічних форм залежно від первинного біохімічного дефекту [4]. Сумарна частота, з якою зустрічаються ЛХН, становить 1 : 7 000 новонароджених, але індивідуальна частота більшості захворювань з цієї групи становить менше ніж 1 : 100 000 [4]. Така рідкісність, а також значна генетична гетерогенність та клінічний поліморфізм ЛХН обумовлюють необхідність використання двох-етапного підходу до біохімічної діагностики цих захворювань: скринінгового етапу, який дозволяє відокремити невелику групу осіб з високою ймовірністю ЛХН серед великої групи осіб з підозрою на наявність цієї патології;

та етапу підтверджувальної діагностики, який забезпечує нозологічну діагностику ЛХН шляхом виявлення первинного біохімічного дефекту, тобто дефіциту активності певної лізосомальної гідролази. Біохімічний скринінг в ході діагностики спадкових метаболічних захворювань проводиться серед великої кількості осіб, тому з цією метою використовують нескладні, часто якісні методи аналізу, що не потребують значних витрат на їх проведення. Одним із таких методів аналізу речовин є тонкошарова хроматографія (ТШХ).

ТШХ олігосахаридів на силікагелі вперше було використано в 1972 році для первинного селективного скринінгу пацієнтів з ЛХН [5]. Патологічний процес накопичення нерозщеплених глікопротеїнів або гліколіпідів у лізосомах, обумовлений дефіцитом відповідних лізосомальних гідролаз у хворих із ЛХН призводить до утворення великої кількості олігосахаридних молекул та підвищення їх екскреції із сечею. Таким чином, виявлення в сечі гіперекскреції олігосахаридів різної довжини може свідчити про наявність у пацієнта ЛХН.

Слід зазначити, що ефективність використання певного методу діагностики напряму залежить від його специфічності, тобто від можливості з високою вірогідністю розмежувати норму і патологію [6]. Саме таке розмежування за проведення ТШХ олігосахаридів часто дуже ускладнене. Відомо, що незначна кількість вуглеводів та олігосахаридів присутні в сечі здорової людини [3], включаючи глюко-тетрасахариди, що утворюються в разі руйнування глікогену [7] і три-, пентасахариди, наявність яких залежить від системи групи крові АВО, гормонального статусу і дієти [8]. Збільшення кількості олігосахаридів у сечі спостерігається у вагітних жінок [9], у новонароджених немовлят, які харчуються грудним молоком та в недоношених немовлят [10]. Таким чином, використання методу ТШХ олігосахаридів сечі для селективного скринінгу ЛХН буде мати високу ефективність лише в разі здатності диференціювати специфічні зміни, характерні для фізіологічної олігосахаридурії та ЛХН. Це дозволить знизити ймовірність хибнопозитивної або хибнонегативної діагностики відповідної патології за селективного скринінгу і, як наслідок, раціональніше використовувати складні, високовартісні методи підтверджувальної діагностики ЛХН.

Метою нашої роботи був аналіз результатів ТШХ олігосахаридів сечі у здорових осіб різних вікових груп та в пацієнтів із ЛХН для розробки практичних рекомендацій щодо диференціації норми і патології в ході селективного біохімічного скринінгу ЛХН.

### Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження була добова сеча здорових дітей віком до 1 року (20 осіб), від 1 до 5 років (20 осіб) та дітей віком старше за 5 років (20 осіб), а також пацієнтів (1867 осіб) із різних регіонів України, які звернулися за консультацією в Медико-генетичний центр (МГЦ) і Центр метаболічних захворювань (ЦМЗ) НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України з підозрою на наявність спадкових хвороб обміну речовин.

Для дослідження використовували зразки добової сечі. ТШХ олігосахаридів проводили на пластинах довжиною 20 см із покриттям Silica gel 60 на алюмінієвій підкладці (Merck, Німеччина). Перед використанням пластини прогрівали на нагрівальному пристрої УСП-1М при 100 °С протягом 15 хв. Зразки нативної сечі центрифугували при 2000 g протягом 10 хв, після чого супернатант використовували для нанесення на ТШХ-пластину та для визначення рівня креатиніну. Рівень креатиніну в сечі визначали за кінетичним методом Яффе із лужним пікратом на автоматичному біохімічному аналізаторі Cobas integra 700 (Roche Diagnostics, Німеччина) і використовували для розрахунку загального об'єму зразка, що наносився на ТШХ-пластину. Зразки на ТШХ-пластини наносили за допомогою капіляра в кількості, еквівалентній 20 мкг/л креатиніну (приблизно 10–20 мкл), тонкою смужкою довжиною 10 мм, підігрівуючи в цей час пластину на нагрівальному пристрої УСП-1М до температури 40 °С [2]. Для проведення ТШХ використовували скляну камеру висотою 20 см. Система розчинників для проведення аналізу складалась з льодяної оцтової кислоти, бутанолу та деіонізованої води в співвідношенні 2 : 1 : 1 відповідно [11]. Як стандарт використовували 10%-й розчин лактози, нанесений в кількості 10 мкл. ТШХ-пластини виймали з камери, коли відстань від верхнього краю пластини до краю фронту розчинника становила 0,5–1,0 см. Пластини висушували при кімнатній температурі у витяжній шафі. Для до-

сягнення вищого ступеня розділення фракцій, прогонку проводили двічі. Для візуалізації фракцій олігосахаридів використовували орциновий реагент (50 мг орцину, 9,5 мл етилового спирту, 0,5 мл 98%-ої сірчаної кислоти), який наносили методом поливання ТШХ-пластин із подальшим прогріванням пластини при 100 °С до появи забарвлення [11].

Швидкість руху речовини під час проведення ТШХ залежить від виду розчинника, сорбенту та техніки експерименту. Для інтерпретації результатів ТШХ олігосахаридів у сечі використовували значення відносного коефіцієнта рухливості з лактозою як референтної речовини ( $R_{lac}$ ), а для оцінки якості проведення ТШХ використовували розрахунок абсолютного коефіцієнта рухливості референтної речовини ( $R_f$ ) [12]:

$$R_{lac} = \frac{A}{B}, R_f = \frac{B}{V},$$

де А – відстань, яку пройшла речовина, що визначається; В – відстань, яку пройшла референтна речовина (лактоза); В – відстань, яку пройшов фронт розчинника.

Аналізуючи результати, не враховували зразки, в яких значення  $R_f$  лактози становило менше 0,28, тому що за таких умов неможливо візуалізувати та вірно ідентифікувати всі фракції олігосахаридів.

### Результати та обговорення

Олігосахариди, які накопичуються в сечі у пацієнтів із ЛХН, характеризуються наявністю 3–8 сахаридних залишків у своїй структурі [1]. Таким чином, фракції олігосахаридів, які мають діагностичне для ЛХН значення, характеризуються значенням  $R_{lac} < 1$  і на ТШХ-пластині розміщуються між стартом і фракцією лактози. В існуючій на сьогодні методичній літературі основним критерієм виключення патологічної олігосахаридурії вважається відсутність на ТШХ-пластині фракцій олігосахаридів із  $R_{lac} < 1$  [13, 14]. Але на практиці повна відсутність таких фракцій зустрічається дуже рідко, особливо в дітей раннього віку. Це значно ускладнює інтерпретацію результатів ТШХ олігосахаридів сечі і призводить до збільшення кількості хибно-позитивних результатів біохімічного скринінгу на ЛХН. Тому нами було проведено оцінку фізіологічної олігосахаридурії, характерної для

здорових осіб різних вікових груп, з метою розробки об'єктивних критеріїв її визначення.

Також було проаналізовано екскрецію олігосахаридів із сечею в трьох групах дітей: I група – діти раннього віку до одного року (20 осіб); II група – діти від 1-го року до 5 років (20 осіб); III група – особи старше 5 років (20 осіб).

Під час виділення саме цих вікових груп брали до уваги, що основною причиною виникнення фізіологічної олігосахаридурії в людини є високий вміст у продуктах харчування олігосахаридів, які не перетравлюються в шлунково-кишковому тракті [15]. Зважаючи на те, що основним джерелом потрапляння в організм цієї групи олігосахаридів є молочна їжа, віковий розподіл досліджених нами осіб базувався на особливостях харчування, а саме враховувалась частка молочної складової в добовому раціоні осіб різних вікових груп. Діти до року переважно знаходяться на грудному вигодовуванні, а, як відомо, грудне молоко жінки містить найвищу кількість олігосахаридів [10], що може сприяти підвищенню екскреції їх із сечею. У дітей віком 1-5 років частка молочних продуктів в добовому раціоні ще є досить значною, але вони представлені переважно виробами з коров'ячого молока, в якому вміст олігосахаридів менше [16]. У старших дітей (після 5 років) і в дорослих частка молочних продуктів в добовому раціоні зменшується [17], а, отже, екзогенне олігосахаридне навантаження на організм теж зменшується.

Одержані результати дослідження екскреції олігосахаридів із сечею здорових осіб показали, що у переважній більшості дітей I групи (у 18 із 20) спостерігалась наявність характерних фракцій олігосахаридів в сечі (рис. 1). Спектр олігосахаридів (табл. 1), що візуалізувався на ТШХ-пластині в дітей першого року життя, був однотипним і характеризувався наявністю великої кількості фракцій, різних за рухливістю [2, 3]. Однотипність спектра фракцій олігосахаридів у дітей I групи дозволяє говорити про специфічну фізіологічну олігосахаридурію дітей раннього віку, яка обумовлена фізіологічними особливостями цих дітей і характеризується великою кількістю різних за рухливістю фракцій приблизно однакової інтенсивності.

За дослідження сечі більшості дітей II групи (15 із 20) та III групи (12 із 20) спостерігалась

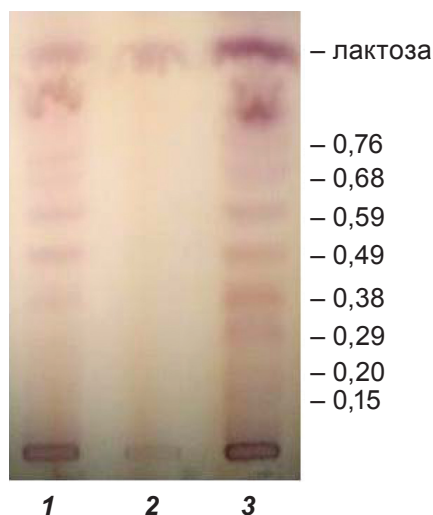


Рис. 1. ТШХ олігосахаридів сечі дітей раннього віку: 1 – зразок, взятий в дитини віком 21 день; 2 – стандарт лактози; 3 – зразок, взятий в дитини віком 6 місяців

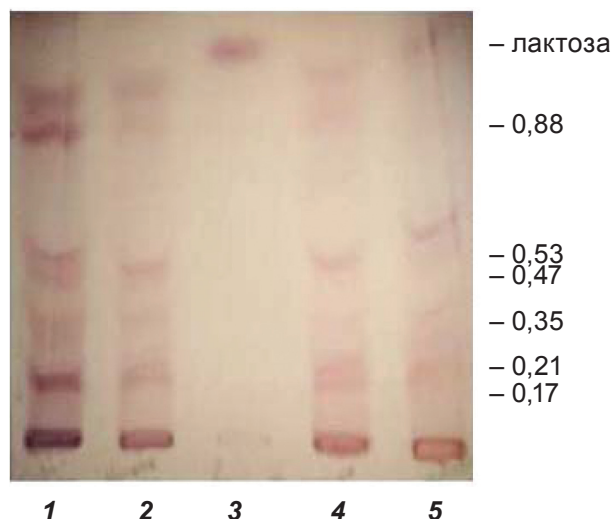


Рис. 2. ТШХ олігосахаридів сечі дітей віком від 1 до 5 років та старших: 1 – дитина віком 1,5 роки; 2 – дитина віком 5 років; 3 – стандарт лактози; 4 – дитина віком 9 років; 5 – особа 37 років

Таблиця 1. Значення  $R_{lac}$  олігосахаридів у здорових дітей

№	I група (0–1 рік)	II (1–5 років) та III група (старше 5 років)
1	0,86–0,90	0,87–0,91
2	0,69–0,76	–
3	0,63–0,68	–
4	0,55–0,63	0,53–0,63
5	0,47–0,50	0,47–0,50
6	0,36–0,42	0,34–0,42
7	0,29–0,33	–
8	0,20–0,28	0,20–0,28
9	0,15–0,21	0,15–0,21

незначна олігосахаридурія, і лише в деяких осіб фракцій олігосахаридів не було виявлено взагалі (рис. 2).

Аналізуючи спектри олігосахаридів, характерні для здорових осіб II та III вікових груп нами було відмічено наявність фракцій з показниками  $R_{lac}$ , що відповідають трьом групам олігосахаридів – легких ( $R_{lac} = 0,87–0,91$ ), середніх ( $R_{lac} = 0,34–0,63$ ) та важких ( $R_{lac} = 0,15–0,28$ ) (табл. 1) [2, 3].

На відміну від спектра, характерного для дітей раннього віку, в здорових осіб II та III груп фракції олігосахаридів були нечіткі, іноді

неоформлені в компактну пляму, але мали приблизно однакову інтенсивність. Таким чином, однотипність спектра олігосахаридів у дітей віком від 1 до 5 років та в дітей віком старше за 5 років і відсутність різниці в значенні  $R_{lac}$  фракцій, що в них виявляються, обумовлює однаковий підхід до оцінки фізіологічної олігосахаридурії в осіб цих вікових груп.

Спираючись на результати ТШХ олігосахаридів, одержані в зразках здорових осіб, нами було проаналізовано спектри олігосахаридів сечі пацієнтів із підозрою на наявність ЛХН. За період 2004–2013 років у лабораторії медичної генетики НДСЛ «ОХМАТ-ДИТ» методом ТШХ олігосахаридів сечі було обстежено 1867 пацієнтів із підозрою на наявність ЛХН. У 87 з них було виявлено патологічні фракції олігосахаридів, які не зустрічались у здорових осіб відповідної вікової групи. Детально проаналізувавши дані клінічного обстеження, цим пацієнтам було проведено ензимодіагностику для підтвердження діагнозу певної лізосомної патології. Діагноз ЛХН було підтверджено в 71 пацієнта (табл. 2).

Аналіз результатів ТШХ олігосахаридів у пацієнтів із підтвердженим діагнозом ЛХН дозволив оцінити спектр специфічних олігосахаридних фракцій, характерний для різної лізосомної патології і на основі цього аналізу виз-

Таблиця 2. Лізосомні хвороби накопичення, виявлені в пацієнтів із патологічною олігосахаридурією

Захворювання	Кількість пацієнтів
Мукополісахаридоз II	30
GM1-гангліозидоз	20
Мукополісахаридоз I	17
Галактосіалідоз	1
Сіалідоз	1
$\alpha$ -Манозидоз	1
Мукополісахаридоз IVB	1

начити критерії диференціальної діагностики ЛХН у пацієнтів з олігосахаридурією.

На рис. 3 показано фрагменти ТШХ-пластин зі спектрами олігосахаридів, виявлених у пацієнтів із підтвердженим діагнозом ЛХН.

Аналізуючи спектр олігосахаридів, що визначався в пацієнтів із підтвердженим діагнозом ЛХН, до уваги брали особливості клінічного перебігу кожного захворювання, а також вік пацієнта на момент обстеження. Всі пацієнти з GM1-гангліозидозом та галактосіалідозом на момент обстеження мали вік до 1 року, тоді як

пацієнти з підтвердженим діагнозом інших ЛХН на момент обстеження були старше 1 року. Тому значення  $R_{lac}$  для виявлених у пацієнтів фракцій олігосахаридів порівнювали із фракціями, характерними для фізіологічної олігосахаридурії в дітей відповідного віку (табл. 3, 4).

Аналіз одержаних результатів показав, що для ЛХН, які супроводжувались патологічною олігосахаридурією, характерним є накопичення різних фракцій олігосахаридів, але діагностично значимими є фракції, які не зустрічаються в контрольних зразках здорових осіб. Так, у пацієнтів із сіалідозом спостерігалась наявність специфічних фракцій олігосахаридів в регіоні  $R_{lac}$  0,20 та 0,75 за відсутності будь-яких інших фракцій. За  $\alpha$ -манозидозу спостерігалась екскреція цілої низки різних за рухливістю олігосахаридів зі значенням  $R_{lac}$  від 0,043 до 0,7, що нехарактерно для здорових осіб старшої вікової групи. Але не всі ЛХН характеризувались наявністю унікальних специфічних патологічних фракцій олігосахаридів. Так, у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та мукополісахаридозом I, II та IV B типу на ТШХ-пластині візуалізувались характерні, добре пофарбовані групи патологічних фракцій олігосахаридів зі значеннями  $R_{lac} < 0,15$ , що відповідають важким довго-

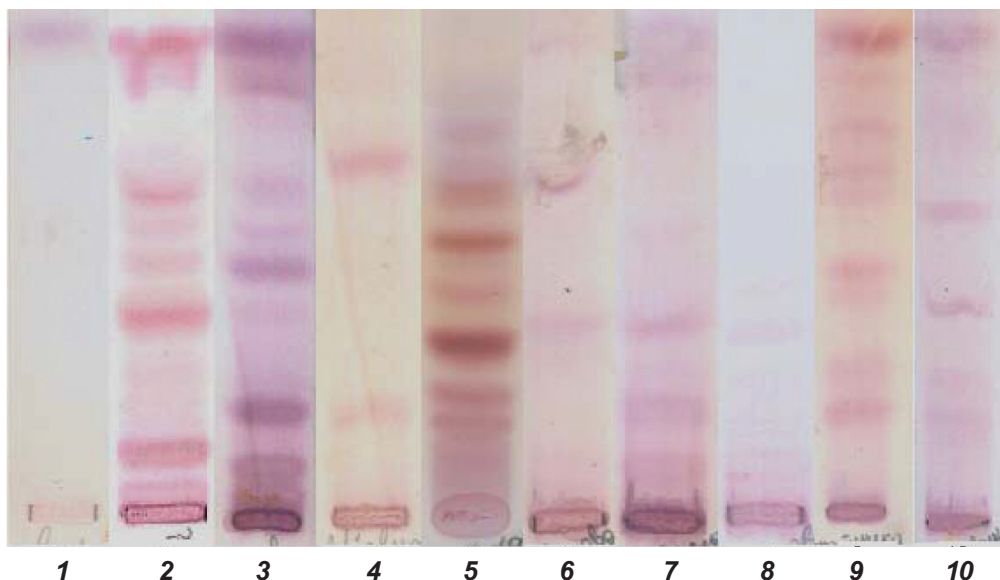


Рис. 3. ТШХ олігосахаридів сечі пацієнтів різного віку з ЛХН: 1 – стандарт лактози; 2 – GM1-гангліозидоз (4 міс.); 3 – галактосіалідоз (7 міс.); 4 – сіалідоз (4 роки); 5 –  $\alpha$ -манозидоз (5 років); 6 – мукополісахаридоз I; 7 – мукополісахаридоз II (9 років); 8 – мукополісахаридоз IVB (7 років); 9 – здорова дитина до першого року життя; 10 – здорова дитина 6 років

Таблиця 3. Значення  $R_{lac}$  фракцій олігосахаридів сечі в пацієнтів із ЛХН до 1 року

Контроль (до 1-го року)	GM1-гангліозидоз ( $n = 20$ )	Галактосіалідоз ( $n = 1$ )
0,86–0,90	–	0,90
0,69–0,76	0,69–0,71	0,69
0,63–0,68	–	–
0,55–0,63	0,59–0,62	0,59
0,47–0,50	0,49–0,50	0,49
0,36–0,42	0,40–0,42	–
0,29–0,33	0,30–0,33	–
0,20–0,28	–	–
0,15–0,21	–	0,19
–	<b>0,11–0,12*</b>	–
–	–	<b>0,08</b>
–	<b>0,043–0,047</b>	<b>0,046</b>

\*Жирним шрифтом виділено фракції, які не зустрічаються в здорових осіб відповідної вікової категорії.

Таблиця 4. Значення  $R_{lac}$  фракцій олігосахаридів сечі в пацієнтів із ЛХН старше 1 року

Контроль (старше 1 року)	Сіалідоз ( $n = 1$ )	Манозидоз ( $n = 1$ )	МПС I ( $n = 17$ )	МПС II ( $n = 30$ )	МПС IV ( $n = 1$ )
0,87–0,91	–	–	–	–	–
–	<b>0,75*</b>	<b>0,70</b>	<b>0,69–0,71</b>	–	–
0,53–0,63	–	0,58	–	–	–
0,47–0,50	–	0,49	–	–	0,47
–	–	<b>0,38</b>	–	–	–
0,34–0,42	–	0,35	0,36–0,38	0,36–0,38	0,34
0,20–0,28	–	0,28	–	–	–
0,15–0,21	<b>0,20</b>	0,20	–	0,20–0,21	–
–	–	<b>0,11</b>	–	–	–
–	–	<b>0,08</b>	<b>0,07–0,09</b>	<b>0,07–0,09</b>	<b>0,09</b>
–	–	<b>0,043</b>	–	–	–

\*Жирним шрифтом виділено фракції, які не зустрічаються в здорових осіб відповідної вікової категорії; МПС – мукополісахаридоз.

ланцюговим олігосахаридам, імовірно гепта- та октасахаридам, відсутнім у здорових осіб всіх вікових груп [2]. Але виявлені в цих пацієнтів спектри олігосахаридів були подібними один до одного, що не давало змогу розрізнити ці захворювання між собою.

Таким чином, на підставі проведених досліджень нами було сформульовано низки

практичних рекомендацій щодо інтерпретації результатів ТШХ олігосахаридів у пацієнтів із підозрою на наявність ЛХН:

1. За проведення ТШХ олігосахаридів сечі обов'язковим є нанесення на пластину паралельно з досліджуваними зразками та розчином референтної речовини (10%-й розчин лактози) двох контрольних зразків сечі дітей до та стар-

ше одного року. Контрольні зразки сечі отримують за стандартним методом зливної сечі осіб відповідного віку [6].

2. Інтерпретація результату ТШХ олігосахаридів пацієнта обов'язково має проводитись у порівнянні з результатом контрольного зразка відповідної вікової категорії.

3. У більшості здорових дітей до одного року життя спостерігається екскреція великої кількості олігосахаридів з  $R_{lac} > 0,15$ , що можна вважати за фізіологічну олігосахаридурію дітей раннього віку.

4. В переважній більшості здорових дітей старше одного року відмічається незначна олігосахаридурія, яка обумовлена особливостями метаболізму; спектр олігосахаридів у зразках сечі здорових дітей віком від одного до п'яти років і осіб старше п'яти років подібний та має однакові значення відносного коефіцієнта рухливості ( $R_{lac}$ ), тому не має різниці в інтерпретації результатів дослідження зразків цих вікових категорій.

5. Рішення про наявність у пацієнта патологічної олігосахаридурії приймається на підставі виявлення фракцій, що не зустрічаються в здорових осіб відповідної вікової категорії, або за умови наявності на хроматограмі, пофарбованій орциновим реагентом, фракцій, які значно відрізняються від контрольних за інтенсивністю забарвлення або за кольором.

6. У всіх випадках виявлення патологічних фракцій олігосахаридів, невластивих для зразків здорових осіб відповідної вікової категорії, необхідно застосовувати діагностику, що підтверджує визначення первинного біохімічного дефекту методами ензимодіагностики в сироватці, лейкоцитах або культурі фібробластів шкіри, а також за допомогою молекулярно-генетичного аналізу.

Діагностика, що підтверджує ЛХН, базується на сучасних методах ензимо- і молекулярної діагностики, доступних лише в

одиночних спеціалізованих лабораторіях, тому що потребують значних фінансових витрат та великого досвіду. Цим обумовлена необхідність раціонального відбору пацієнтів із високою ймовірністю ЛХН шляхом впровадження ефективних засобів селективного біохімічного скринінгу цієї патології в регіонах країни. Дотримання сформульованих нами рекомендацій за інтерпретації результатів селективного біохімічного скринінгу ЛХН, які супроводжуються патологічною олігосахаридурією, дозволить забезпечити широке використання цього методу, знизити ймовірність хибнопозитивної діагностики ЛХН і, як наслідок, раціональніше застосовувати високовартісні методи підтверджувальної діагностики цієї групи спадкових захворювань для підвищення якості надання медичної допомоги хворим.

Таким чином, можна дійти таких висновків:

1. За інтерпретації результатів ТШХ олігосахаридів у пацієнтів із підозрою на наявність ЛХН необхідно враховувати наявність фізіологічної олігосахаридурії в дітей різних вікових категорій.

2. Патологічна олігосахаридурія, обумовлена різними формами ЛХН, характеризується наявністю специфічних фракцій олігосахаридів, які не зустрічаються в здорових осіб відповідної вікової категорії.

3. Обмеженням використання методу ТШХ олігосахаридів є його неспецифічність щодо окремих лізосомних захворювань, що обумовлює доцільність використання методу ТШХ олігосахаридів сечі лише для первинного біохімічного скринінгу пацієнтів із підозрою на лізосомну патологію.

4. У всіх випадках виявлення позитивних результатів аналізу олігосахаридів сечі методом ТШХ потрібне підтвердження діагнозу шляхом виявлення первинного біохімічного або генетичного дефекту.

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НОРМЫ И ПАТОЛОГИИ ПРИ СЕЛЕКТИВНОМ БИОХИМИЧЕСКОМ СКРИНИНГЕ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСКРЕЦИЕЙ ОЛИГОСАХАРИДОВ**

*Н. И. Мыцьк<sup>1,2</sup>, Н. В. Ольхович<sup>1,2</sup>,  
Н. Г. Горovenko<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>Национальная детская специализированная больница «Охматдет» МЗ Украины, Киев;

<sup>2</sup>ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев;

<sup>3</sup>Национальная медицинская академия последиplomного образования им.

П. Л. Шупика, Киев, Украина;

e-mail: mytskyk\_nat@ukr.net

Олигосахариды представляют собой класс полимерных углеводов, входящих в состав гликозидной части молекул гликопротеинов и гликолипидов. Нарушение функции лизосомальных гидролаз при лизосомных болезнях накопления (ЛБН) приводит к частичному или полному отсутствию деградации определенных гликопротеинов и гликолипидов и, как следствие, к накоплению в лизосомах клеток характерных олигосахаридных цепей и повышению их экскреции с мочой. Целью нашей работы был детальный анализ результатов тонкослойной хроматографии (ТСХ) олигосахаридов мочи у здоровых лиц разных возрастных групп и у пациентов с ЛБН для разработки практических рекомендаций относительно дифференциации нормы и патологии при селективном биохимическом скрининге ЛБН. Полученные результаты показали, что у большинства здоровых лиц на ТСХ-пластинах отмечалась незначительная экскреция целого ряда олигосахаридов с  $R_{lac} > 0,15$ , что можно характеризовать как физиологическую олигосахаридурию, которая обусловлена особенностями пищевого рациона детей разного возраста и метаболизма в лизосомах. Поэтому при интерпретации образцов мочи пациентов с подозрением на наличие ЛБН диагностически значимым на ТСХ-пластинах является наличие групп олигосахаридов, которые не встречаются в образцах здоровых лиц, а также все фракции со значением  $R_{lac} < 0,15$ .

Ключевые слова: олигосахариды, ТСХ, олигосахаридурия, лизосомные болезни накопления.

**DIFFERENTIATION OF NORM AND PATHOLOGY DURING SELECTIVE BIOCHEMICAL SKREENING OF LYSOSOMAL STORAGE DISEASES WITH INCREASED EXCRETION OF OLIGOSACCHARIDES**

*N. Y. Mytskyk<sup>1,2</sup>, N. V. Olkhovych<sup>1,2</sup>,  
N. G. Gorovenko<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>National Children's Specialized Hospital Ohmatdyt, Kyiv, Ukraine;

<sup>2</sup>SI Institute of Genetic and Regenerative Medicine, NAMS of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup>P. L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine;

e-mail: mytskyk\_nat@ukr.net

Oligosaccharides are a class of polymeric carbohydrates, which are constituents of a glycoside portion of glycoprotein and glycolipid molecules. The lysosomal hydrolase dysfunction due to lysosomal storage disorders results in partial or complete failure of degradation of some glycoproteins and glycolipids, causing the accumulation of specific undegraded substrates in the lysosomes of cells, the formation of the great number of oligosaccharide chains and their increased excretion with urine. Our work was aimed at detailed study of the specificities of interpreting the results of thin-layer chromatography (TLC) of urine oligosaccharides in healthy persons of different age groups with the purpose of further application of these data while differentiating the norm and pathology in the course of primary selective screening of lysosomal storage disorders. The results obtained demonstrated that TLC plates for the majority of healthy persons had insignificant excretion of a number of oligosaccharides (from monosaccharides to hexasaccharides) with  $R_{lac} > 0.15$ , which can be characterized as physiological oligosacchariduria, conditioned by the metabolism specificities in lysosomes. Therefore while interpreting the urine samples of patients with the suspected lysosomal storage disorder it is diagnostically reasonable to examine the TLC plates for the presence of both oligosaccharide groups, absent in the samples of healthy persons, and all the fractions with  $R_{lac} < 0.15$ .



**Key words:** oligosaccharides, TLC, oligosacchariduria, lysosomal storage disorders.

### References

1. Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. Harper's Biochemistry. M.: Myr, 1993:299-309. (In Russian).
2. Blau N., Duran M., Gibson M. K. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics. Springer, 2008:325-331.
3. Sewell A. C. Urinary oligosaccharides. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. Wiley-Liss, 1991:219-231.
4. Mehta A., Winchester B. Lysosomal storage disorders: a practical guide. Wiley-Blackwell, 2012:6-46.
5. Palo J., Savolainen H. Studies on serum and urinary glycopeptides and glycosaminoglycans in aspartylglucosaminuria. *Clin. Chim. Acta.* 1972;36:431-437.
6. Dolgova V. V., Menshikov V. V. Clinical laboratory diagnostics. GEOTAR-media, 2013; Vol. 1:928 p. (In Russian).
7. Kumlien J. Urinary excretion of a glucose containing tetrasaccharide. A parameter for increased degradation of glycogen. *Clin. Chim. Acta.* 1988;176:39-48.
8. Moreno F. J., Sanz M. L. Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity. Wiley-Blackwell, 2014; 552 p.
9. Kuczynski T. W., Kendzierski K. S., Sewell A. C. Urinary oligosaccharides in pregnant or lactating women: a pitfall in screening. *Clin. Chem.* 1993;39:2346-2347.
10. Boehm G., Stahl B. Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 2007; 137(3):847-849.
11. Rybakova K. D., Kuz'micheva N. A. Biochemical methods of diagnosis of hereditary diseases. Moscow, 1984:32-35. (In Russian).
12. Geiss F. Basics TLC. Moscow, 1999;1:176-188. (In Russian).
13. Sewell A. C. Simple laboratory determination of excess oligosacchariduria. *Clin. Chem.* 1981;27:243-245.
14. Krasnopskaya K. D. Hereditary diseases of a metabolism. The handbook for doctors. Moscow, 2005:24-26. (In Russian).
15. Zducczyk Z. Physiological effect of low digestible oligosaccharides in diets for animals and humans. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2004;13/54:115-130.
16. Ovchinnikov Y. A. Bioorganic chemistry. M.: Prosvesthenie, 1987:496-498. (In Russian).
17. Gidding S. S., Dennison B. A., Birch L. L., Daniels S. R., Gilman M. V., Lichtenstein A. H., Rattay K. T., Steinberger J., Stettler N., Horn L. V. Dietary Recommendations for Children and Adolescents. *Circulation.* 2005;112:2063.

Отримано 10.11.2014